

О Т З Ы В

Официального оппонента на диссертационную работу Должиковой Марии Александровны «**Оценка генетического разнообразия, генетическое картирование с помощью SNP и SSR маркеров красной смородины (*Ribes rubrum* L.)**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «Генетика».

Оценка генетического разнообразия красной смородины, а также изучение структурной и функциональной организации генома образцов смородины из биоресурсной коллекции ВНИИСПК является актуальной фундаментальной и практической задачей. В настоящее время на создание нового сорта красной смородины необходимо не менее 14 лет. В настоящее время для селекции недостаточно использовать классические методы, необходимо подключать современные методы исследования с использованием ДНК маркеров. Разработка генетической карты красной смородины с локализацией в геноме количественных и качественных хозяйственно-важных признаков будет способствовать ускоренному созданию новых сортов красной смородины с заданными свойствами. Не маловажной остается и задача защиты авторских прав селекционеров, на новые сорта, и идентификация сортовой принадлежности, решением этой задачи будет создание ДНК паспортов

В этой связи, диссертационная работа Должиковой Марии Александровны, посвященная оценке генетического разнообразия и генетическому картированию с помощью SNP и SSR маркеров красной смородины, несомненно является важной и актуальной. В работе автор использует современные молекулярно-генетические методы и подходы. Впервые в мире построена генетическая карта красной смородины на основе ДНК маркеров, которая является основой для выявления в генотипе генов, детерминирующих хозяйственно-ценные признаки. Разработаны методики ДНК идентификации сортов красной смородины, применимые для практического использования. Подобран набор микросателлитных локусов и отработана методика их применения на образцах красной смородины.

Работа выполнена по стандартам, предусмотренным к кандидатским диссертациям и изложена на 160 страницах. Состоит из введения, основной части, содержащей 9 таблиц и 10 рисунков, заключения, списка литературы, включающего 219 источников, в том числе 138 на иностранном языке, и трех приложений.

В главе 1.1 «**Обзора литературы**» приводится анализ литературных данных об объекте исследования – красной смородине, представлены морфологические данные, ареал и хозяйственное значение ягод красной смородины. В главе 1.2 приводится описание

различных видов и применение ДНК маркеров, в том числе проводится более подробное описание нескольких видов ДНК маркеров, включая SSR и SNP, о которых пойдет речь в данном исследовании. В главе 1.3 рассматривается вопрос эффективной идентификации сортов сельскохозяйственных растений: от морфологических признаков до генетической паспортизации с применением SSR маркеров, о важности применения ДНК маркеров. В главе 1.4 собраны литературные данные о методах генетического картирования, о создании генетических карт сцепления, о насыщении генетических карт маркерами, в том числе SSR и SNP, а также о картировании QTL на хромосомах сельскохозяйственных культур для выявления локусов, ассоциированных с хозяйственно-важными признаками. В целом, обзор содержит необходимую информацию для введения в проблему и понимания важности и своевременности сформулированных задач данного исследования.

В главе 2 «**Материалы и методы**» описана выборка данного исследования, включающая 74 сорта красной смородины, а также географическое происхождение сортов. Достаточно подробно описаны методы исследований, включающие: «Отбор растительного материала»; «Выделение ДНК»; «SSR маркеры»; «ПЦР – анализ и разделение ПЦР-продуктов, электрофорез»; «GBS анализ» и «Статистическая обработка полученных данных».

По всем перечисленным методам получены **результаты**, которые приведены автором в главе 3. В данной работе была проведена оценка генетического разнообразия исследуемой выборки из 74 сортов смородины красной. Исследование позволило подобрать мультиплексные наборы для 14 микросателлитных локусов. Были выявлены гетерозиготные локусы, а также определено число уникальных и редких аллелей у сортов выборки по изучаемым локусам, проведена идентификация генотипов, подобраны сорта-контроли. Впервые была создана и запатентована база данных микросателлитных локусов красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК, впервые созданы генетические паспорта для 18 сортов смородины красной. На основе результатов SSR анализа построена дендрограмма генетического сходства сортов красной смородины, основная часть сортов объединилась в кластеры, в соответствии со своим происхождением. Дополнительно к микросателлитным маркерам выполнена оценка генетического разнообразия сортов красной смородины с применением GBS метода и SNP маркеров, соответственно. Построен график MDS и определена популяционная структура исследуемой выборки. Выявлено 6 субпопуляций в данной выборке, объединяющие сорта выборки, согласно их родственным. Дополнительно к 74 образцам выборки был выявлен полиморфизм микросателлитных локусов гибридной семьи 133 семян красной смородины от скрещивания сорта Белая Потапенко и гибридной формы 1426-21-80. На основании SSR и SNP маркеров составлена

первая в мире генетическая карта групп сцепления красной смородины. В результате картирования построено 8 групп сцепления, в которые вошли 12 микросателлитных и 287 SNP маркеров.

В «**Заключении**» подводятся общие итоги работы, кратко описываются полученные результаты. Выводы, сделанные в работе, являются обоснованными и соответствуют поставленным задачам. Имеются практические рекомендации для дальнейших селекционных работ с красной смородиной, что несомненно усиливает практическую значимость исследования. Работа дополнена тремя приложениями, которые включают таблицу с родословными сортов исследуемой выборки и генетические паспорта 17 сортов красной смородины.

Диссертационная работа Должиковой Марии Александровны выполнена на высоком квалификационном уровне. Положения, выносимые на защиту, основываются на большом объеме экспериментальных данных и их биоинформатической обработке. Соискатель успешно справился с поставленными задачами. Автореферат диссертации оформлен по всем правилам. Содержит основные положения представленной работы. По результатам диссертации опубликовано 8 научных статей, в том числе и в зарубежных журналах. Для базы данных микросателлитных локусов 128 генотипов красной смородины имеется свидетельство о государственной регистрации.

Имеются незначительные замечания и вопросы к работе:

1 Глава 1.1. Вопрос, касающийся систематики рода *Ribes*. Автор сообщает, что данная тема является дискуссионной и проблематичной. Какой систематикой пользуется сам автор?

2.Глава 1.2. В описании различных видов ДНК маркеров лучше привести какую-либо классификацию ДНК маркеров, например, маркеры на основе ПЦР и на основе гибридизации. Не совсем понятное определение «хорошего» маркера и доминантных и кодоминантных маркеров: определение «можно разделить на индивидуально определяемые, как правило, кодоминантные, и на те, которые являются множественными, как правило, доминантные маркеры» не отражает основную разницу между кодоминантными и доминантными маркерами. Более подробно описаны RAPD, AFLP, ISSR, SSR и SNP с чем связан выбор именно этих маркеров?

3. Глава 1.4. На странице 33 приводится понятие QTL, тогда как его расшифровка дана на странице 35. На странице 36 сообщается, что GWAS – это «картирование ассоциаций в масштабах всего генома», все-таки GWAS – это полногеномный анализ ассоциаций или поиск ассоциаций (между фенотипом и генотипом). Также несколько нелогично, что первое упоминание о неравновесном сцеплении и объяснение понятия дается на странице 36, а

далее на странице 39 снова дается объяснение этого понятия, лучше объединить все в одном месте. Вы пишете, что методы «картирования QTL были успешно использованы на таких объектах, как томаты, кукуруза, арабидопсис, горох...» и ставите одону ссылку: Чесноков, 2013 – это обзорная статья, здесь нужны ссылки на оригинальные статьи, в которых описываются исследования по упомянутым объектам.

4. Глава 2.2.3. Выделение ДНК: «ДНК выделяли из листьев СТАВ методом по методике Doyle с модификациями». Подскажите, какие модификации применяли?

5. Глава 2.2.4. «Сиквенсы остальных пар праймеров (SSR) были разработаны ...». Следует написать последовательности пар праймеров

6. Глава 2.2.6. GBS-анализ: выполняли ли Вы самостоятельно рестрикцию геномной ДНК, как получается из текста главы или делали в сторонней организации? Сколько получилось выявить всего SNP данным методом?

7. Глава 3.1 Здесь и далее: нет термина сортообразцы, лучше заменить на образцы или сорта «ДНК маркёры проявили различный уровень полиморфизма от 3 до 16 аллелей», лучше в данном случае указать PIC (от 0,51 до 0,84), как уровень полиморфизма. Вы использовали 14 маркеров, удалось ли определить минимальное количество микросателлитных локусов необходимо, чтобы различить все 74 сорта выборки?

8. Глава 3.4 Название главы «Изучение генетического разнообразия сортов красной смородины на основании кластерного анализа по данным микросателлитных локусов» лучше исправить на «Оценка генетического разнообразия». Подскажите, с применением какого метода кластерного анализа была построена дендрограмма?

9. Глава 3.5 Для исследование генетического разнообразия красной смородины с помощью GBS анализа проводили ли еще какую-либо фильтрацию SNP маркеров, кроме тех, которые были плохо прочитаны у большого количества образцов? Какие сорта Вы относите к старым и основным? Или группе старых и основных сортов?

10. «Заключение». В главе «Материалы и методы» Вами указана выборка 74 сорта красной смородины, далее у Вас эта есть цифра 75 (в данных по популяционной структуре) и 76 – в «Заключении». В материалах стоит сразу описать выборку 76 сортов. Требуют уточнения и исправления предложений: 1) «Сравнивая данные микросателлитных локусов и GBS анализа» – это разные маркеры; 2): «...практически у всех групп сортов с высокой будстреп поддержкой так же объединились в кластеры при проведении GBS анализа» - по результатам GBS анализа.

Указанные замечания не влияют на основные результаты диссертационной работы и не снижают ценности проведенного исследования.

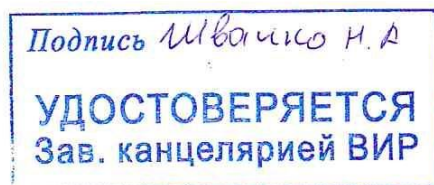
Заключение

Диссертационная работа Должиковой Марии Александровны на тему «Оценка генетического разнообразия, генетическое картирование с помощью SNP и SSR маркеров красной смородины (*Ribes rubrum* L.)» является законченным научным исследованием, содержит новые результаты в области генетики и практические рекомендации для дальнейших работ селекционеров и генетиков с красной смородиной. Это комплексная работа, включающая современные молекулярно-генетические исследования и классические работы по генетике и селекции в полевых условиях. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения и подтверждается публикациями, как в российских, так и в зарубежных изданиях. По актуальности, новизне и практической ценности полученных результатов работа Должиковой Марии Александровны полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013г. № 842 в редакции с изменениями от 28.08.2017г. № 1024, 01.10.2018 № 1168 и от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика

Кандидат биологических наук
по специальности 03.02.07 Генетика,
ведущий научный сотрудник
ио заведующего лабораторией
постгеномных исследований
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»



Швачко Наталия Альбертовна



Должиковой Т.И.

